

Untersuchungen zur Synthese und zum
Metabolismus von Aminosäuren in Larven des
Wildtyps und der Letalmutanten *l(3)tr* und
l(2)me von *Drosophila melanogaster*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophischen Fakultät II

der

Universität Zürich

von

Bruno Widmer

aus Winterthur/ZH

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. P. S. CHEN

1973

Zürich 1972

Curriculum vitae

Mein Name ist Bruno Gottfried Widmer. Ich bin Schweizerbürger, heimatberechtigt in Winterthur (ZH) und Mosnang (SG). Am 16. Juni 1943 wurde ich in Winterthur geboren. Hier besuchte ich auch die Primarschule. Im Frühjahr 1956 trat ich in die Abteilung Gymnasium der Kantonsschule Winterthur ein. Dort erhielt ich im September 1962 das Maturitätszeugnis, Typus B.

Im selben Jahr immatrikulierte ich mich an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich. Hier konnte ich Vorlesungen und Kurse bei den folgenden Dozenten besuchen: BIEGERT, J., BILLETER, M., BURLA, H., CHEN, P. S., EUGSTER, C. H., GEHRING, W., HADORN, E., HARTMANN-FRICK, H., HEDIGER, H., HÜNERMANN, K. A., JUNGEN-HAUSCHTECK, E., KUHN-SCHNYDER, E., LEUTHARDT, F., MARKGRAF, F., OBERHOLZER, R., PFEIFFER, W., RAST, D., RIEBER, H., ROHWEDER, O., RUTISHAUSER, A., SAUTER, W., SCHAEPI, H., SCHMID, H., SCHNITTER, M., SCHUMACHER, E., STÜSSI, B., TARDENT, P., TÖNDURY, G., TRÜMPY, R., URSPRUNG, H., VISCONTINI, M., WANNER, H., WEBER, H., WEHNER, R., WEISSMANN, CH., ZIEGLER, B. und ZISWILER, V.

1968 schloss ich mein Studium mit dem Diplom als Naturwissenschaftler (Hauptfach Zoologie) ab. Unter Leitung von Herrn Prof. Dr. P. S. CHEN entstand dann meine Dissertation. Seit 1969 bin ich Assistent am Zoologisch-Vergleichend Anatomischen Institut der Universität Zürich.

UNTERSUCHUNGEN ZUR SYNTHESE UND ZUM METABOLISMUS VON AMINOSÄUREN IN LARVEN DES WILDTYPS UND DER LETALMUTANTEN *l(3)tr* UND *l(2)me* VON *DROSOPHILA MELANOGASTER**

BRUNO WIDMER†

Zoologisch-Vergl. Anatomisches Institut der Universität Zürich, Switzerland

(Received 8 September, 1972)

ABSTRACT

Free and protein-bound amino-acids of *Drosophila melanogaster* larvae of the wild type and the lethal mutants, *l(3)tr* and *l(2)me*, reared aseptically on a semi-defined medium have been studied. The contents of free, ninhydrin-positive components are closely related to fresh weights. Compared to larvae reared on standard medium those raised under sterile conditions have a lower protein content, particularly the genotype *lme*.

Molar concentrations of free amino-acids are higher in *ltr*-larvae than in the wild-type. To a lesser extent the same is true for protein-bound amino-acids. By contrast, there is a reduction of the amino-acid concentration in *lme*-larvae, with the exception of free glycine, whereby the free amino-acids are more affected than the protein-bound ones.

The relative pattern of free amino-acids is specific for each genotype. There is an accumulation of glutamine and lysine in *ltr* and glycine and threonine in *lme*. On the other hand, the amino-acid patterns in protein hydrolysates are similar for all three genotypes.

After feeding the larvae with [¹⁴C]glucose the following amino-acids were found to be labelled in all three genotypes: α -alanine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, proline, serine, threonine, glutamine, and an unknown substance (U_3). In addition, tyrosine and phenylalanine were radioactive in the wild type, β -alanine, tyrosine, and valine in *ltr* and arginine/histidine, asparagine, leucine/isoleucine, and valine in *lme*.

The relative distribution of radioactivity varies with free and protein-bound amino-acids as well as with the genotypes.

The specific activities show that the relative rate of amino-acid synthesis from glucose depends on the genotype. Furthermore, differences in specific activities between free and protein-bound amino-acids have been observed, indicating that the free amino-acid pool does not represent the pool available to protein synthesis.

In contrast to the generally accepted view, glycine and threonine are synthesized to such an extent that they should not be designated as essential for *Drosophila melanogaster*. There are also indications from the present study that phenylalanine, valine, leucine/isoleucine, and arginine/histidine may probably be non-essential too.

* Die vorliegende Arbeit wurde teilweise mit Unterstützung durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung durchgeführt. Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. P. S. Chen, danke ich herzlich für die Leitung und Förderung dieser Arbeit.

† Present Address: Biozentrum der Universität, Abt. Zellbiologie, Klingelbergstr. 70, CH-4056 Basel, Switzerland.

An *in vitro* assay of the synthetic activity of threonine aldolase has been carried out for the first time in insects. The specific activity exhibits similar changes during larval development of both the wild type and the mutant *lme*, but falls off distinctly before pupation in *ltr*.

Changes in specific activity of glutamine synthetase have been found by *in vitro* analysis to be similar during larval development of the wild type and the mutant *ltr*, whereas *lme* shows an increase prior to pupation. There is no correlation between enzymatic activity and glutamine content of the larvae.

AUCH im Zeitalter der biochemischen und molekularen Genetik hat *Drosophila*, eines der klassischen Objekte der genetischen Forschung, seine Bedeutung behauptet. In unserem Institut beschäftigt man sich seit vielen Jahren nicht nur mit morphologischen Aberrationen mutanter Genotypen, sondern in immer stärkerem Masse auch mit den diesen Phänomenen zugrunde liegenden Schädigungen auf biochemischer Ebene. In diesen Forschungen nehmen die Letalfaktoren *l(2)me* und *l(3)tr* eine zentrale Stellung ein. Eine Reihe von Untersuchungen wurden durchgeführt zum Aminosäuremuster und seinen ontogenetischen Veränderungen, zur Protein- und Nukleinsäuresynthese sowie zu spezifischen Schritten des intermediären Stoffwechsels (für eine Uebersicht vgl. Chen, 1971).

Es hat sich gezeigt, dass bei den erwähnten Letalmutanten die Konzentrationen verschiedener Aminosäuren von den Verhältnissen beim Wildtyp abweichen. Solche Resultate legten den Wunsch nahe, Einzelheiten über Aufnahme und Synthese der Aminosäuren bei *Drosophila* zu erfahren. Ein weiterer Anlass für derartige Untersuchungen ergab sich aus der Tatsache, dass im Zusammenhang mit sterilen, definierten Zuchtmedien die Frage der essentiellen Aminosäuren einer näheren Ueberprüfung bedurfte.

Bisherige Untersuchungen an *Drosophila* zu diesen Problemen liegen zeitlich weit zurück und wurden nicht immer unter den besten Voraussetzungen durchgeführt. Es handelt sich um Fütterungsversuche, deren Interpretation vor allem wegen der Verflechtungen im Metabolismus ganzer Gruppen von Aminosäuren schwierig ist (Harper, Benevenga, und Wohlueter, 1970). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode mittels Fütterung radioaktiver Glucose wurde 1952 von Steele eingeführt. Sie hat gegenüber klassischen Fütterungsexperimenten vor allem den Vorteil, dass dabei die Balance zwischen den verschiedenen Aminosäuren nicht beeinflusst wird. Wesentlich ist auch, dass das Stickstoffangebot weder qualitativ noch quantitativ verändert werden muss.

MATERIAL UND METHODEN

1. VERSUCHSTIERE UND ZUCHTMETHODEN

Die Larven des Wildtyps stammen aus Gelegen des Stammes 'Sevelen'. Im weiteren gelangten Larven zweier Letalmutanten zur Untersuchung, nämlich '*lethal(3)translucida*' (*ltr*: 3, 18, 1-22, 0) und '*lethal(2) meander*' (*lme*: 2, 71-73). Aus der Kreuzung (*ltr*, *Ubx*/TM 1, *Mé*, *ri*, *sbd*¹) × (*ltr*, *Sb*/*In(3L)P*, *In(3R)P* 18, *Mé*, *Ubx*, *e*⁴) gingen die homozygoten Larven der Mutante *ltr* hervor. *lme*/*lme*-Tiere entstanden aus der Kreuzung *Cy*/*lme* *inter se*.

Die frisch abgelegten Eier wurden während 7 Minuten (*ltr*: 12 Minuten) in 3% Calciumhypochlorit dechorioniert, mit sterilem Wasser gespült und in einer Sterilkammer auf autoklaviertes, synthetisches Medium übertragen. Dieses Futter wurde nach Angaben von Sang (1956) zusammengesetzt, wobei im Medium C anstatt 3 g Agar nur 2,5 g verwendet wurden. Ebenso wurde auch die Menge Casein auf 5,0 g reduziert. Im Hinblick auf die Markierungsexperimente wurden die 0,75 g Fructose durch die minimale Menge von 0,3 g Saccharose ersetzt. Die



Futtermischung wurde zusätzlich nach Angaben von Geer (1965) mit 80 mg L-Arginin, 50 mg D,L-Tryptophan und 30 mg L-Cystin pro 100 ml supplementiert. Die Entwicklung lief bei 25° C im Thermostaten ab. Unter diesen Bedingungen wird das Puppenstadium erst nach 5 Tagen anstatt 4 (*ltr*: 6 Tage) erreicht (Church und Robertson, 1966). Zur Ueberprüfung der Sterilität wurden Eier und Larven auf Nährbrühhagar (Difco) während 72^h bei 37° C inkubiert.

2. MARKIERUNG DER AMINOSÄUREN MIT ¹⁴C-(U)-GLUCOSE

Zu diesem Zweck wurden Larven auf dem oben erwähnten sterilen Medium aufgezogen, dem auf 3 ml Futter 50 µC ¹⁴C-(U)-Glucose (300 mC/mM, Radiochemical Centre, Amersham) beige-mischt waren.

Die Larven wurden 5 Tage (+/+ , *lme/lme*) oder 6 Tage (*ltr/ltr*) nach Eiablage verarbeitet. Pro Ansatz wurden 8 (*ltr/ltr*), 10 (+/+) oder 40 (*lme/lme*) Larven in Wasser gewaschen, in konischen Glashomogenisatoren in wenig 0,3 n Perchlorsäure (PCA) homogenisiert und mit PCA auf 300 µl aufgefüllt. Um die Fällung der Proteine zu vervollständigen, wurden die Proben 2 Minuten in siedendes Wasser getaucht. Der Niederschlag wurde 4 × mit je 300 µl 0,3 n PCA gewaschen und alle Ueberstände vereinigt. Der Extrakt wurde mit 400 µl 1,5 n KOH neutralisiert und dann in kochendem Wasser unter Durchleiten von Luft bis zur Trockene eingedampft. Aus dem dabei entstandenen schwerlöslichen Kaliumperchlorat wurden die Aminosäuren 3 × mit je 200 µl 80 % Aethanol ausgewaschen und anschliessend auf ca. 50 µl eingengt.

Der Rückstand wurde 2 × mit je 300 µl Aether-Aethanol (1 : 3) gewaschen und anschliessend die Proteine mit 300 µl konz. Ameisensäure herausgelöst. Nach Zentrifugation wurden 150 µl des Ueberstehenden in eine Ampulle gegeben und daraus die Ameisensäure abgedampft. Dann wurden 600 µl 6 n HCl zugegeben und während 16^h bei 110° C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde im Exsiccator über Phosphorpentoxyd und NaOH getrocknet und in 100 µl 80 % Aethanol aufgenommen.

3. AUFTRENNUNG UND BESTIMMUNG DER AMINOSÄUREN

Die papierchromatographische Auftrennung erfolgte zweidimensional in 70 % Propanol und wassergesättigtem Phenol (Chen und Diem, 1961). Für die Hochspannungselektrophorese erfolgte die Auftrennung nach Briegel (1969). Die Konzentration der ninhydrinpositiven Substanzen wurde nach der Methode von Fischer und Dörfel (1953) bestimmt.

4. BESTIMMUNG DER PROTEINMENGEN

Diese erfolgte nach der Biuret-Methode. Die Eichkurven wurden mit Rinderserumalbumin erstellt (Fluka, Buchs).

5. MESSUNG DER RADIOAKTIVITÄT

Die Chromatogramme wurden mit 0,01 % Ninhydrin in Aceton entwickelt (30 Minuten bei 60° C) und während 1^h gut gelüftet, um ¹⁴CO₂ aus dem Papier zu entfernen. Die nur schwach angefärbten Substanzflecken wurden ausgeschnitten, zu Zylindern gedreht und in Zählfläschchen aus Kunststoff gestellt (Loftfield, 1960). Dazu wurden 15 ml Szintillatorgemisch (8 g Butyl-PBD/1000 ml Toluol) gegeben und die Aktivität in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (Nuclear Chicago, Mark 1) gemessen. Für diese Methode wurde eine Zählausbeute von 55 % bestimmt.

Für den *in vitro* Versuch der Threoninsynthese wurden die Chromatogramme mit nur 0,004 % Ninhydrin in Aceton entwickelt, um den Aktivitätsverlust durch Bildung von ¹⁴CO₂ vernachlässigen zu können (Levenbook und Krishna, 1971). Die Messung der Papierstücke erfolgte wie oben beschrieben.

6. AUTORADIOGRAPHIE

Die Chromatogramme wurden mit dem Szintillator Butyl-PBD (Ciba) besprüht, im Luftstrom getrocknet und anschliessend mit Röntgenfilm Kodirex (Kodak) abgedeckt. Dank der verstärkenden Wirkung des Szintillators genügte eine Exposition während 3 Wochen bei 4° C. Die Filme wurden für 5 Minuten in Kodak D-19 entwickelt und 2–5 Minuten in Kodak 'Unifix' (Verdünnung B) fixiert. Anschliessend wurde gewässert und getrocknet.

Die zugehörigen Chromatogramme wurden mit 0,5 % Ninhydrin (in Aceton) entwickelt und das Fleckenmuster mit dem Schwärzungsmuster des Films verglichen.

7. *in vitro*-SYSTEM ZUM NACHWEIS DER THREONINSYNTHESE

Es wurde darauf geachtet, in jedem Ansatz vergleichbare Mengen Protein zu haben. Dementsprechend wurden je nach Genotyp und Stadium 25–100 Larven in Phosphatpuffer nach Sørensen (0,067 m, pH = 7,1) plus Phenylthioharnstoff (PTC) bei 0° C homogenisiert und mit Puffer auf das gewünschte Endvolumen (150–500 µl) aufgefüllt. Nach dem Zentrifugieren wurden pro Ansatz 50 µl des Ueberstehenden verwendet und zunächst mit 5 µl Pyridoxalphosphat (0,002 m) während 10 Minuten bei 25° C vorinkubiert. Die eigentliche Inkubation wurde bei 37° C im Schüttelbad durchgeführt. Nach 1 Minute Temperatúrausgleich wurde die Reaktion gestartet durch Zugabe von 5 µl Inkubationsmedium der folgenden Zusammensetzung: 30 µl Pyridoxalphosphat (0,002 m); 20 µl ¹⁴C-(U)-Glycin (= 1,0 µC; 108 mC/mM, Radiochemical Centre, Amersham; 2 µl Acetaldehyd (= 35,6 µM). Nach 30 Minuten wurde die Reaktion gestoppt durch Zugabe von 300 µl abs. Aethanol. Die gefällten Proteine wurden abzentrifugiert, der Rückstand 3 × mit 80% Aethanol gewaschen, die

Tabelle I.—FRISCHGEWICHTE STERILER LARVEN DES WILDTYPS UND DER MUTANTEN *ltr* UND *lme*

GENOTYP UND ALTER	n	FRISCHGEWICHT/LARVE (mg)
+/+ (5d)	6	1,52 ± 0,03
<i>ltr/ltr</i> (6d)	17	3,29 ± 0,16
<i>lme/lme</i> (5d)	9	0,18 ± 0,01

Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte und deren mittlere Fehler.

Ueberstände vereinigt und eingengt. Dann wurde die Probe auf Chromatographiepapier Whatman 3 MM aufgetragen, zusammen mit 0,1 µM reinem, kaltem Threonin als Trägersubstanz. Auftrennung und Aktivitätsmessung erfolgten wie bereits beschrieben (S. 00). Parallel dazu wurde der Proteingehalt des zentrifugierten Homogenates gemessen.

8. *in vitro*-SYSTEM ZUM NACHWEIS DER GLUTAMINSYNTHESE

Es wurde darauf geachtet, in jedem Ansatz vergleichbare Enzymaktivitäten zu haben. Deshalb wurden je nach Genotyp und Stadium 20–150 Larven in Imidazol/HCl-Puffer (0,025 m, pH = 7,0) plus PTC bei 0° C. homogenisiert und mit Puffer auf das gewünschte Endvolumen (60–100 µl) aufgefüllt. Dann wurde das Homogenat zentrifugiert. Das Ueberstehende wurde verwendet für den Enzymsatz und die Proteinbestimmung. Pro Ansatz wurden in 180 µl Puffer folgende Reagenzien in das Reaktionsgefäß gegeben:—

20 µM L-Glutaminsäure
20 µM Hydroxylamin
4 µM Magnesiumchlorid
10 µM L-Cystein
1,5 µM ATP.

Die Inkubation erfolgte im Schüttelbad bei 37° C. Gestartet wurde die Reaktion nach 1 Minute Temperatúrausgleich durch Zugabe von 20 µl Homogenat. Nach 10 Minuten wurden 20 µl 65% Trichloressigsäure (TCA) zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die gefällten Proteine wurden abzentrifugiert und 150 µl vom Ueberstehenden abpipettiert.

Das im Enzymversuch gebildete L-Glutamyl-γ-monohydroxamat bildet bei tiefem pH mit Fe³⁺-Ionen einen braunvioletten Komplex, dessen Extinktion gemessen werden kann (Lipmann und Tuttle, 1945). Dazu wurden 150 µl vom Ueberstehenden mit 15 µl 7,8 n HCl versetzt und anschliessend 15 µl 13% FeCl₃ · 6 H₂O (in 0,26 n HCl) zugegeben (Woolfolk, Shapiro, und Stadtman, 1966). Nach 5–30 Minuten wurde die Extinktion bei 500 nm im Photospektrometer Beckman—DU gemessen. Die Umrechnung in molare Konzentrationen des Produktes wurde anhand einer Eichkurve vorgenommen. Diese Kurve wurde erstellt mit reinem L-Glutamyl-γ-monohydroxamat (Sigma, St. Louis).

RESULTATE

1. FRISCHGEWICHT UND PROTEINGEHALT STERILER LARVEN

Diese Grössen wurden bestimmt, um den Einfluss der Sterilität auf das Wachstum zu erfassen, sowie um sie als Bezugssysteme zur Verfügung zu haben. Die Resultate sind in *Tab. I* und *Abb. 1* dargestellt.

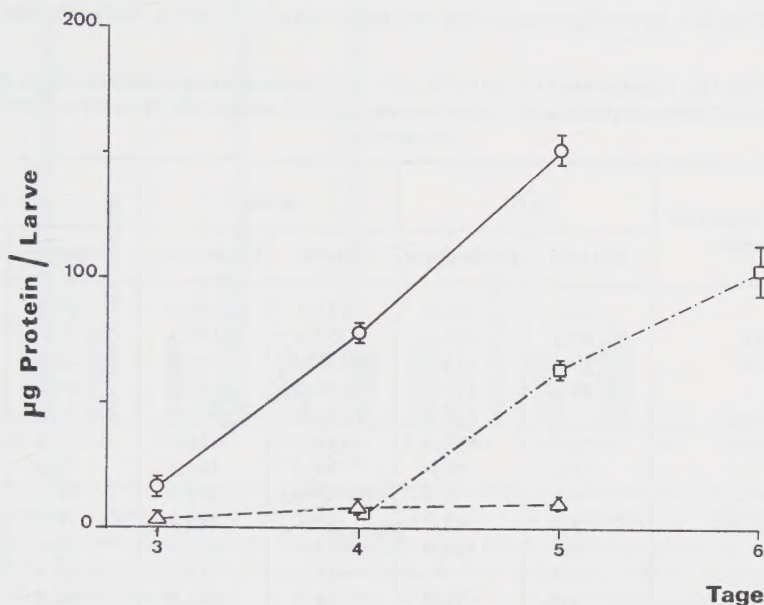


ABB. 1.—Proteingehalt verschieden alter Larven der Genotypen +/+ (○—○), *ltr/ltr* (□- - -□) und *lme/lme* (△- - -△).

2. KONZENTRATION DER FREIEN AMINOSÄUREN

Für Prolin, Taurin und Asparagin konnten keine zuverlässigen Eichkuren bestimmt werden, da die Färbung schlecht reproduzierbar ist. Die Extinktionen für β -Alanin sind so gering, dass auf eine Berechnung der absoluten Konzentrationen ebenfalls verzichtet werden musste. Arginin und Histidin überlappen auf dem Chromatogramm und haben so stark verschiedene Färbungseigenschaften, dass eine Konzentrationsschätzung nicht möglich ist.

In *Tab. II* sind die molaren Konzentrationen der erfassten Aminosäuren angegeben. Dabei sind die einzelnen Werte bei *ltr* durchwegs höher als für den Wildtyp. Dagegen sind die Werte für *lme* erniedrigt, eine Ausnahme bildet nur Glycin (eventuell auch noch Threonin).

Für einen Vergleich der stark unterschiedlichen Genotypen eignen sich relative Daten am besten. Deshalb gelangen in *Abb. 2* die prozentualen Werte der einzelnen Konzentrationen zur Darstellung. Bei *ltr* zeigt sich im Extrakt eine relative Anhäufung von Glutamin und Lysin/Ornithin im Vergleich zu +/+. Im Extrakt der Mutante *lme* erscheinen im Vergleich zum Wildtyp Glycin und Threonin relativ angereichert.

4. KONZENTRATION DER PROTEINGEBUNDENEN AMINOSÄUREN

Wie *Tab. II* zeigt, sind bei allen 3 Genotypen die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren im Hydrolysat grösser als im freien Pool. Die einzige Ausnahme bildet

das Glycin, welches bei der Mutante *lme* im Extrakt fast gleich stark konzentriert ist wie im Proteinhydrolysat. Bei dieser Mutante ist auch insgesamt das Verhältnis Hydrolysat/Extrakt kleiner als bei den beiden anderen Genotypen. Die Gesamtkonzentration an Aminosäuren ist bei *ltr* am grössten (ca. $4 \times +/+$), wobei in erster Linie die freien erhöht sind. Bei *lme* ist die Gesamtkonzentration am geringsten (ca. $1/3$ von $+/+$), wobei vor allem die proteingebundenen reduziert sind. Gleiche Verhältnisse zwischen

Tabelle II.—MOLARE KONZENTRATIONEN ($\mu\text{M. } 10^{-3}/10$ LARVEN) NINHYDRINPOSITIVER SUBSTANZEN IM EXTRAKT UND PROTEINHYDROLYSAT VERPUPPUNGSREIFER LARVEN DES WILDTYPS, DER MUTANTEN *ltr* UND *lme*

NINHYDRINPOSITIVE SUBSTANZEN	+/+		<i>ltr/ltr</i>		<i>lme/lme</i>	
	Extrakt	Hydrolysat	Extrakt	Hydrolysat	Extrakt	Hydrolysat
α -Alanin	49,0	154,2	181,1	420,0	28,3	45,3
Asparaginsäure	27,5	156,3	67,5	536,1	16,0	48,3
Glutaminsäure	36,9	143,1	(mit Thr)	600,3	6,0	47,7
Glycin	28,9	137,1	110,0	457,5	40,2	43,5
Leucin/Isoleucin	5,4	258,9	54,8	801,3	2,7	67,2
Lysin/Ornithin	34,7	178,5	330,7	429,0	5,5	34,2
Serin	11,9	78,0	62,5	294,3	6,4	24,0
Threonin	10,1	85,8	(mit Glu)	303,6	11,1	32,7
Tyrosin	7,9	45,6	58,1	255,9	1,7	18,0
Valin	9,1	144,0	74,5	375,0	7,0	42,0
Methionin	3,1	—	15,0	30,0	0,3	1,2
Phenylalanin	1,9	75,9	15,0	303,6	0,5	27,0
Glutamin	8,9	—	204,0	—	5,9	—
Total	235,3	1'457,4	1'173,2	4'806,6	131,6	431,1

Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte.

den betrachteten Genotypen zeigt auch das Frischgewicht der Larven (vgl. Tab. I). Bei *lme* ist parallel der Proteingehalt pro Larve stark reduziert (vgl. Abb. 1).

Das Muster der relativen Konzentrationen zeigt keine deutlichen Unterschiede zwischen den betrachteten Genotypen (vgl. Abb. 3).

4. RADIOAKTIVITÄT DER FREIEN AMINOSÄUREN

Ueber dem Background liegende Aktivität zeigen α -Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Prolin, Serin, Threonin, Glutamin sowie eine unbekannte Substanz (U_3) bei allen Genotypen. Dazu kommen β -Alanin, Tyrosin und Valin bei *ltr* und Arginin/Histidin, Asparagin, Valin und einige Unbekannte bei *lme*.

Wie Tab. III zeigt, haben beim Wildtyp α -Alanin und Glutaminsäure den grössten Anteil an der Gesamtaktivität. Bei *ltr* sind es α -Alanin, Glutamin und Glutaminsäure, sowie α -Alanin und Glycin bei *lme*. Vergleicht man das Muster zwischen den 3 Genotypen, so zeigt sich, dass Prolin, Serin, Tyrosin, Valin, Asparagin und Glutamin bei *ltr* relativ stärker markiert sind als bei $+/+$. Bei *lme* sind dagegen Arginin/Histidin, Glycin, Threonin und Asparagin relativ stärker markiert als beim Wildtyp.

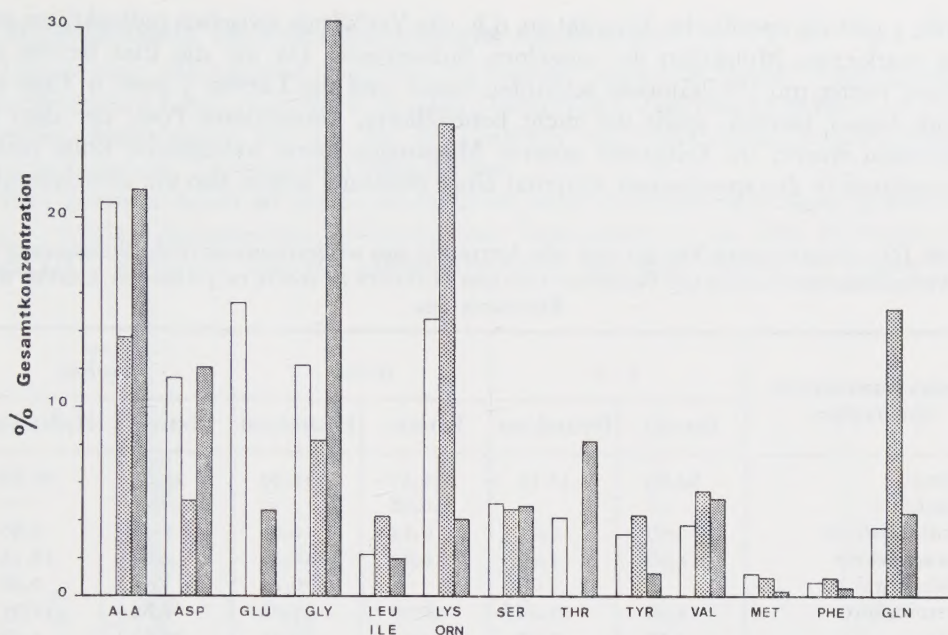


ABB. 2.—Prozentuale Verteilung der ninhydrinpositiven Substanzen im Extrakt verpuppungsreifer Larven des Wildtyps (□) und der Mutante *ltr* (▨) sowie in 5-tägigen Larven der Mutante *lme* (▩). Die Werte beziehen sich auf die Summe der molaren Konzentrationen jedes Genotypes. ALA = α -Alanin, ASP = Asparaginsäure, GLU = Glutaminsäure, GLY = Glycin, LEU/ILE = Leucin/Isoleucin, LYS/ORN = Lysin/Ornithin, SER = Serin, THR = Threonin, TYR = Tyrosin, VAL = Valin, MET = Methionin, PHE = Phenylalanin, GLN = Glutamin.

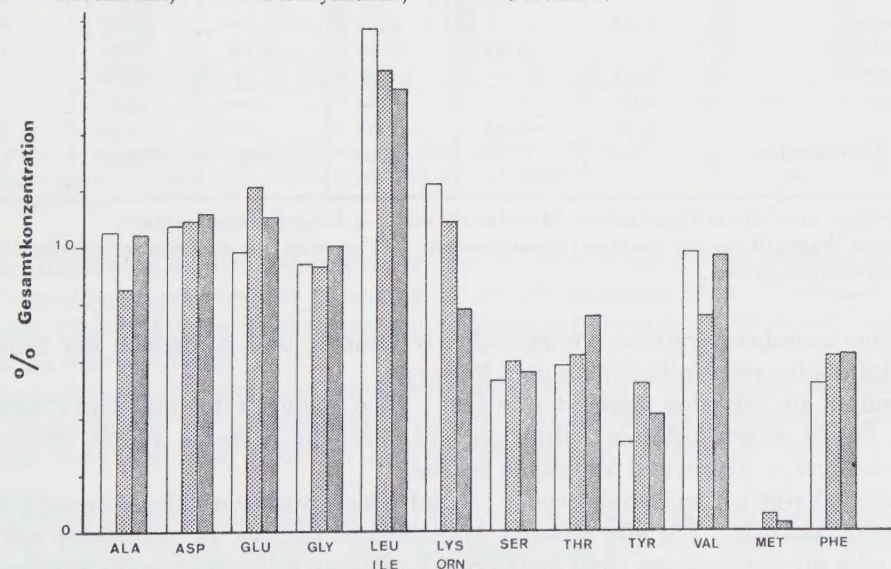


ABB. 3.—Prozentuale Verteilung der ninhydrinpositiven Substanzen im Proteinhydrolysat verpuppungsreifer Larven des Wildtyps und der Mutante *ltr* sowie in 5-tägigen Larven der Mutante *lme*. Die Werte beziehen sich auf die Summe der molaren Konzentrationen jedes Genotypes.

Abb. 4 gibt die spezifische Aktivität an, d.h. das Verhältnis zwischen radioaktiven und nicht markierten Molekülen der einzelnen Substanzen. Da wir die Eier bereits auf sterilem Futter mit [^{14}C]Glucose schlüpfen lassen und die Larven 5 bzw. 6 Tage auf diesem Futter bleiben, spielt der nicht kontrollierte, unmarkierte Pool, der dem Ei mitgegeben wurde, im Zeitpunkt unserer Messungen keine wesentliche Rolle mehr. Unterschiede in der spezifischen Aktivität einer Substanz zeigen also ein abweichendes

Tabelle III.—PROZENTUALE VERTEILUNG DER AKTIVITÄT DER NINHYDRINPOSITIVEN SUBSTANZEN IN VERPUPPUNGSREIFEN LARVEN DES WILDTYPS UND DER MUTANTE *ltr* SOWIE IN 5-TÄGIGEN LARVEN DER MUTANTE *lme*

NINHYDRINPOSITIVE SUBSTANZEN	+/+		<i>ltr/ltr</i>		<i>lme/lme</i>	
	Extrakt	Hydrolysat	Extrakt	Hydrolysat	Extrakt	Hydrolysat
α -Alanin	64,69	41,12	54,57	32,39	25,89	27,89
β -Alanin	—	—	0,28	—	—	—
Arginin/Histidin	0,07	0,01	0,14	0,09	1,72	0,67
Asparaginsäure	4,66	17,45	0,85	18,56	2,64	18,12
Cysteinsäure	—	—	—	0,14	—	0,26
Glutaminsäure	14,96	27,28*	10,26	33,98	8,82	31,01
Glycin	3,07	3,72	2,14	2,61	23,63	4,56
Leucin/Isoleucin	0,01	0,15	0,07	0,03	0,21	2,94
Lysin/Ornithin	0,04	—	0,21	—	0,34	0,02
Prolin	0,73	0,23	1,81	0,16	1,12	0,39
Serin	1,71	6,23	3,99	7,84	2,95	5,71
Threonin	1,73	—	1,71	1,40	5,74	2,77
Tyrosin	0,14	0,44	0,32	0,07	0,29	0,56
Valin	—	0,04	0,55	2,58	1,06	3,52
Methionin	0,34	—	0,12	—	0,27	0,06
Phenylalanin	—	2,93	0,10	0,05	0,01	1,29
Asparagin	0,35	—	2,66	—	0,80	—
Glutamin	6,68	—	18,84	—	4,21	—
U ₃	0,77	0,35	1,07	—	0,38	0,13
weitere Unbekannte	—	—	0,20	0,03	5,96	0,01

Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte aus 4–9 Einzelbestimmungen.

* Dieser Wert gilt für die Summe Glutaminsäure + Threonin, die sich aus technischen Gründen nicht trennen liessen.

Verhältnis zwischen Synthese aus radioaktiver Glucose und Aufnahme der Substanz oder nicht markierter Vorläufer aus dem Futter an.

Spezifisch am stärksten markiert sind bei +/+ α -Alanin, Glutamin und Glutaminsäure. Bei *ltr* zeigen α -Alanin, Glutamin und Serin die höchsten Werte, ebenso wie Glutaminsäure, α -Alanin und Methionin bei *lme*.

Bei einem Vergleich der Extrakte von +/+ und *ltr* zeigt nur Valin in der Mutante grössere spezifische Aktivität. Für alle anderen Aminosäuren ist also die Aufnahme aus dem Futter oder die Synthese aus nicht markierten Vorläufern im Verhältnis zur Synthese aus [^{14}C]Glucose gegenüber dem Wildtyp gesteigert. Vergleichen wir die Werte von *lme* mit +/+, so zeigen Valin, Glycin und Glutaminsäure in den letalen Larven grössere spezifische Aktivität als beim Wildtyp.

5. RADIOAKTIVITÄT DER PROTEINGEBUNDENEN AMINOSÄUREN

Ueber dem Background liegende Aktivitäten zeigen α -Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin und Serin bei allen 3 Genotypen. Dazu kommen bei $+/+$ Prolin, Tyrosin, Phenylalanin und U_3 , bei *ltr* Threonin und Valin, sowie Arginin/Histidin, Leucin/Isoleucin, Threonin und Valin bei *lme*.

Den grössten Anteil an der Gesamtaktivität haben α -Alanin und Asparaginsäure bei $+/+$, sowie Glutaminsäure, α -Alanin und Asparaginsäure bei den Mutanten (vgl. Tab. III). Vergleicht man die letalen Genotypen mit dem Wildtyp, so zeigen Valin,

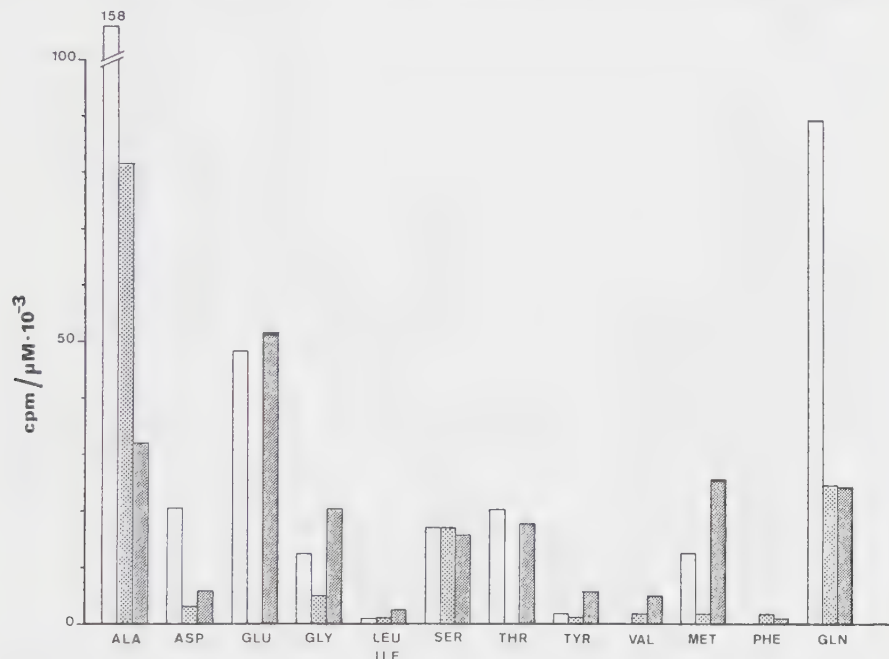


ABB. 4.—Spezifische Aktivitäten der ninhydrinpositiven Substanzen im Extrakt verpuppungsreifer Larven des Wildtyps und der Mutante *ltr* sowie in 5-tägigen Larven der Mutante *lme*.

Serin, Glutaminsäure und Asparaginsäure bei *ltr* grössere relative Aktivität als bei $+/+$. Im Proteinhydrolysat von *lme* haben Valin, Arginin/Histidin, Leucin/Isoleucin, Prolin, Tyrosin, Glycin, Glutaminsäure und Asparaginsäure grösseren Anteil an der Gesamtaktivität als beim Wildtyp.

Vergleicht man Extrakt und Proteinhydrolysat in allen 3 Genotypen, so ergibt sich, dass Prolin immer im Extrakt relativ stärker markiert ist, Asparaginsäure und Serin dagegen im Hydrolysat. Für alle anderen Substanzen variiert das Muster mit dem Genotyp.

Spezifisch am stärksten markiert sind bei $+/+$ α -Alanin, Asparaginsäure und Serin, sowie α -Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure bei den zwei Mutanten (vgl. Abb. 5).

Ein Vergleich zwischen $+/+$ und *ltr* ergibt bei der Mutante nur für Valin höhere Werte, also wie bei den freien Aminosäuren (vgl. S. 188). Bei *lme* zeigen Valin und Leucin/Isoleucin grössere spezifische Aktivität als beim Wildtyp.

Vergleicht man Extrakt und Proteinhydrolysat innerhalb jedes Genotyps, so zeigt sich, dass nur Asparaginsäure ein konstantes Verhalten aufweist, indem sie immer im Hydrolysat stärker markiert ist als im Extrakt. Alle anderen Aminosäuren zeigen genotypische Variationen im Muster. Bei $+/+$ sind alle spezifischen Aktivitäten im Hydrolysat grösser als im Extrakt. Das bedeutet, dass beim Wildtyp aus Kohlenhydrat synthetisierte Aminosäuren bevorzugt direkt in die Proteinsynthese eingehen. Der Pool der so erfassten freien Aminosäuren ist also nicht identisch mit demjenigen, der für die

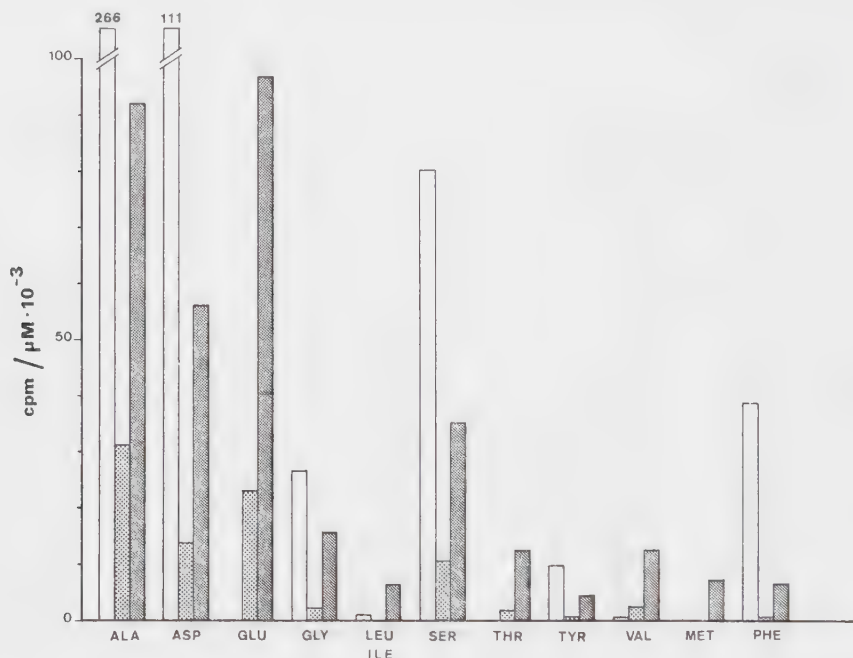


ABB. 5.—Spezifische Aktivitäten der ninhydrinpositiven Substanzen im Proteinhydrolysat verpuppungsreifer Larven des Wildtyps und der Mutante *litr* sowie in 5-tägigen Larven der Mutante *lme*.

Proteinsynthese zur Verfügung steht. Dabei sind die Differenzen genotypisch verschieden.

Betrachtet man die Summe von Extrakt und Hydrolysat (Abb. 6), so zeigt *litr* für jede Aminosäure tiefere spezifische Aktivität als $+/+$ oder *lme* (Ausnahme: Valin). Hier ist also die Aufnahme nicht markierter Aminosäuren oder deren Vorläufer aus dem Futter relativ am grössten. Dagegen ist beim Wildtyp die Synthese aus $[^{14}\text{C}]$ Glucose relativ am stärksten, die spezifischen Aktivitäten sind hier am grössten. Eine Ausnahme machen nur Leucin/Isoleucin und Valin, die bei *lme* am höchsten markiert sind.

6. ESSENTIELLE AMINOSÄUREN

Tab. IV zeigt, dass Glycin und Threonin in allen 3 Genotypen aus dem Kohlenstoffgerüst der Glucose aufgebaut werden können. Bei *litr* zeigt zusätzlich Valin starke Markierung. Interessant ist, dass bei *lme* die meisten der 'essentiellen' Aminosäuren markiert sind.

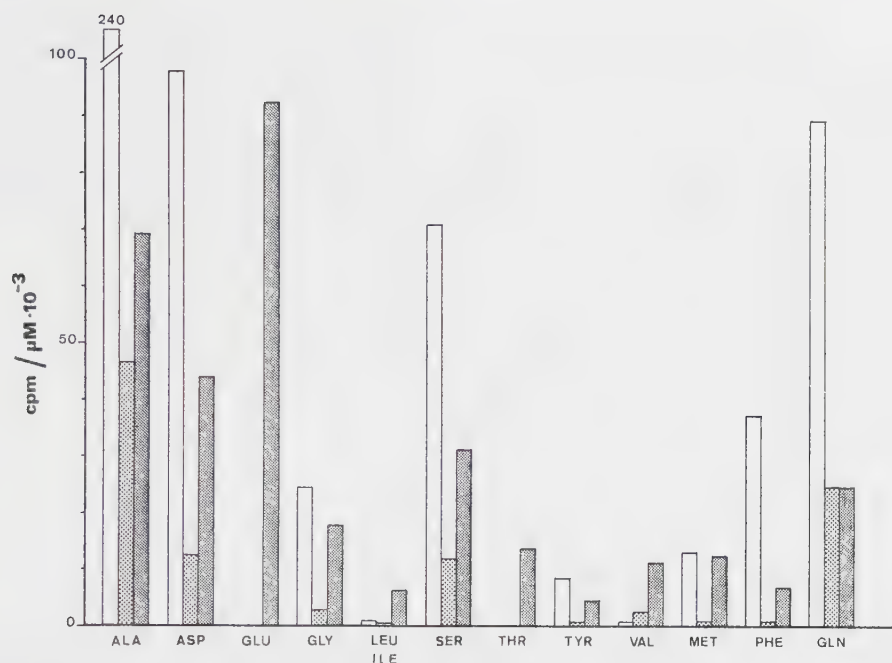


ABB. 6.—Spezifische Aktivitäten der ninhydrinpositiven Substanzen (Extrakt+Proteinhydrolysat) in verpuppungsreifen Larven des Wildtyps und der Mutante *ltr* sowie in 5-tägigen Larven der Mutante *lme*.

Tabelle IV.—MARKIERUNG ESSENTIELLER AMINOSÄUREN IN VERPUPPUNGSREIFEN LARVEN DES WILDTYPS UND DER MUTANTEN *ltr* UND *lme*

ESSENTIELLE AMINOSÄUREN	+/+	<i>ltr/ltr</i>	<i>lme/lme</i>
Arginin/Histidin	—	—	+
Glycin	+	+	+
Leucin/Isoleucin	(+)	(+)	+
Lysin/(Ornithin)	—	—	(+)
Threonin	+	+	+
Valin	—	+	+
Methionin	(+)	—	—
Phenylalanin	+	—	+

+ = Messbare Synthese, (+) = Synthese nicht sicher, — = keine messbare Synthese.

7. THREONINSYNTHESE *in vitro*

Einige Eigenschaften der Threoninaldolase werden im Abschnitt Diskussion im Zusammenhang mit Literaturangaben besprochen. In Abb. 7 sind die gemessenen Aktivitäten pro mg Protein in 30 Minuten angegeben. Die Larvenhomogenate des Wildtyps und der Mutante *lme* zeigen übereinstimmenden Verlauf der Enzymaktivität. Diese sinkt vom 3. auf den 4. Tag auf etwa $\frac{1}{2}$ ab und steigt vor der Verpuppung wieder

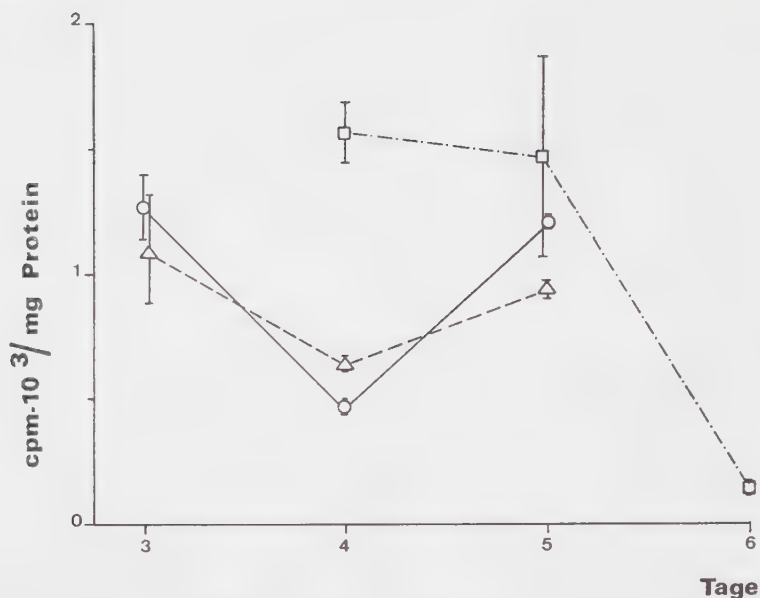


ABB. 7.—Spezifische Aktivität der Threoninaldolase (Synthesereaktion) im Homogenat von 3–6-tägigen Larven der Genotypen $+/+$, ltr/ltr und lme/lme . (Signaturen vgl. Abb. 1).

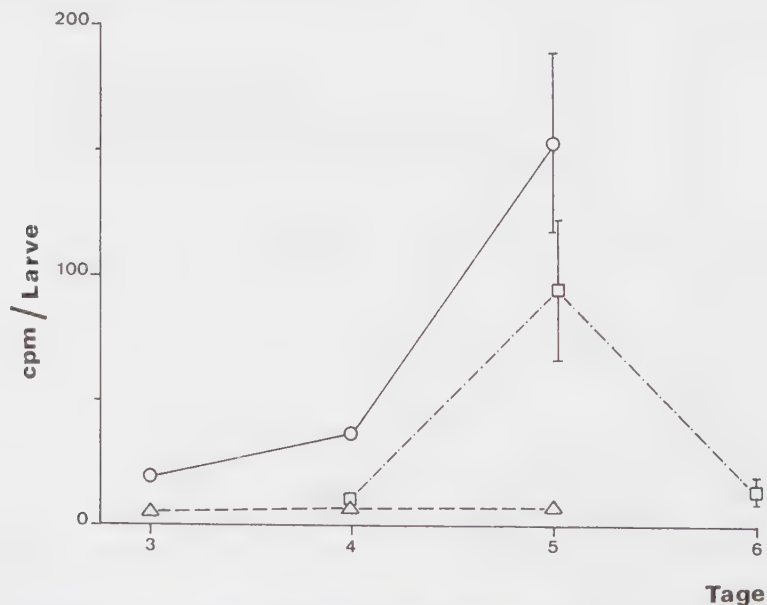


ABB. 8.—Aktivität der Threoninaldolase (Synthesereaktion) pro Tier im Homogenat von 3–6-tägigen Larven der Genotypen $+/+$, ltr/ltr und lme/lme . (Signaturen vgl. Abb. 1).

auf die ursprünglichen Werte an. Für die Larven des Genotypes *ltr* gilt es, die Verzögerung im physiologischen Alter um 24^h zu berücksichtigen. Dabei liegt die spezifische Aktivität an den ersten beiden Tagen höher als bei den anderen Genotypen. Vor der

Verpuppung sinkt der Wert dann auf etwa 10 % ab und liegt damit weit unter den entsprechenden Zahlen für $+/+$ und *lme*.

Betrachtet man die Aktivität pro Larve (Abb. 8) sowie den Proteingehalt der Tiere (Abb. 1), so darf man sagen, dass beim Wildtyp und *lme* sich diese beiden Größen parallel verändern. Dabei bleibt am 4. Tag der Aktivitätsanstieg etwas hinter dem Proteinzuwachs zurück. Auf diese Weise erklärt sich das Absinken der spezifischen Aktivität zu diesem Zeitpunkt. Die homozygoten *ltr*-Larven zeigen dagegen eigenes

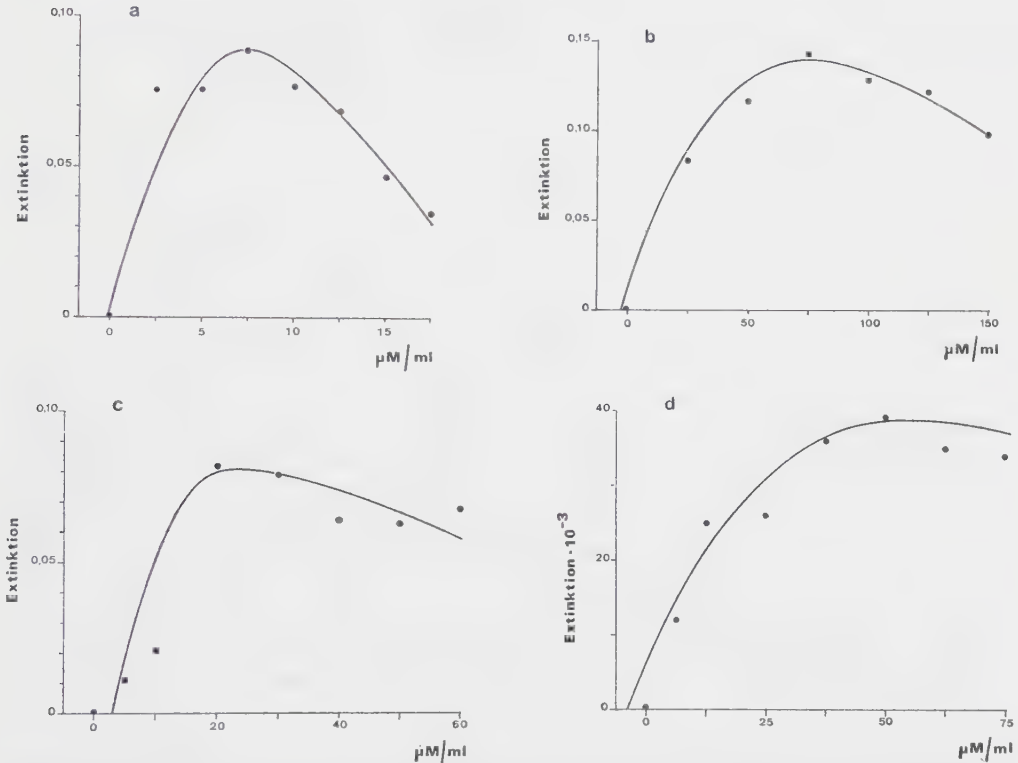


ABB. 9.—Inkubation von Larvenhomogenat (4d, $+/+$). Extinktion des Glutamylhydroxamat-Komplexes in Abhängigkeit verschiedener Komponenten des Inkubationsmediums. a, ATP ($\mu\text{M}/\text{ml}$ Inkubationsgemisch); b, Glutaminsäure ($\mu\text{M}/\text{ml}$ Inkubationsgemisch); c, MgCl_2 ($\mu\text{M}/\text{ml}$ Inkubationsgemisch); d, L-Cystein ($\mu\text{M}/\text{ml}$ Inkubationsgemisch).

Verhalten. Vom 4. auf den 5. Tag steigt zwar die Aktivität auch mehr oder weniger parallel zum Proteingehalt an. Sie fällt dann allerdings vor der Verpuppung auf ca. 15 % ab, während der Proteingehalt weiter ansteigt.

8. GLUTAMINSYNTHESE *in vitro*

In Abb. 9a–d sind einige Eigenschaften der Glutaminsynthetase dargestellt, soweit diese für die Diskussion (S. 197 ff.) von Bedeutung sind.

Mit Levenbook und Kuhn (1962) wollen wir die spezifischen Aktivitäten pro mg Protein (in 10 Minuten) betrachten (vgl. Abb. 10). Diese zeigt im Verlauf der Larvalentwicklung für $+/+$ und *ltr* gleiches Verhalten. Die Aktivität sinkt vom 3. auf den 4. Tag

(4. bis 5. Tag bei *ltr*) ab und bleibt dann bis zur Verpuppung auf diesem Niveau. Dabei liegen die Werte für *ltr* tiefer als für *+/+*. Bei *lme* findet man zunächst intermediäre Werte, die vom 3. auf den 4. Tag ebenfalls absinken. Vom 4. auf den 5. Tag steigt die spezifische Aktivität sehr stark an und liegt dann $2-5\times$ so hoch wie für den Wildtyp oder *ltr*. Zieht man den Glutamingehalt der verschiedenen Larven in Betracht (Tab. II), so

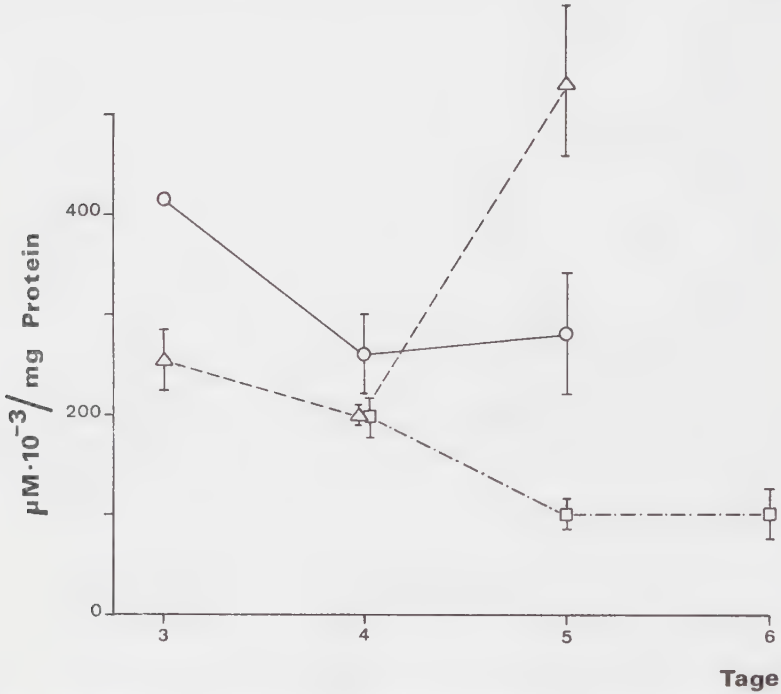


ABB. 10.—Spezifische Aktivität der Glutaminsynthetase im Larvenhomogenat verschiedener Entwicklungsstadien der Genotypen *+/+*, *ltr/ltr* und *lme/lme*. (Signaturen vgl. Abb. 1).

erkennt man, dass keine direkte Beziehung zur Synthetase-Aktivität besteht, auch dann nicht, wenn man diese pro Tier berechnet (Tab. V).

DISKUSSION

1. FRISCHGEWICHT, PROTEINGEHALT UND AMINOSÄURENKONZENTRATION

Es hat sich gezeigt, dass das Frischgewicht der *ltr*-Larven unter den beschriebenen Zuchtbedingungen in weiten Grenzen schwankt. Dabei ist der Gehalt an freien ninhydrinpositiven Substanzen mit diesen Schwankungen korreliert. Die entsprechenden Stoffe im Proteinhydrolysat zeigen diese Abhängigkeit nicht. Die in der vorliegenden Arbeit festgestellten Frischgewichte liegen tiefer als für nicht steril aufgezogene Larven, das zeigt ein Vergleich mit Angaben von Rüegg (1968). Auch auf den Proteingehalt wirkt sich die Sterilität in dem Sinn aus, dass dieser kleiner ist als unter normalen Bedingungen (Baumann, 1969). Dabei bleiben *+/+* und *ltr* in jüngeren Stadien stark zurück und holen das Defizit bis zur Verpuppung fast wieder auf. Am stärksten ist die Reduktion für den Genotyp *lme*. Hier erfolgt bis zum 5. Tag auch kein Ausgleich mehr.

Solche Verhältnisse sind zu erwarten, denn $+/+$ und *ltr* werden nur ihrer Mikroorganismen beraubt. *lme* ist zum vornherein schon geschädigt, weil diese Larven Protein (Casein!) nicht abbauen können (Chen und Hadorn, 1955). Dazu tritt nun offenbar kumulativ der Effekt der Sterilität.

Soweit für die Aminosäuren molare Konzentrationen berechnet werden können, zeigt *ltr* pro Larve durchweg höhere Werte als der Wildtyp. Das konnten schon Hadorn und Stumm-Zollinger (1953) qualitativ demonstrieren. Der Anstieg gilt in erster Linie für

Tabelle V.—AKTIVITÄT DER GLUTAMINSYNTHETASE PRO TIER IM HOMOGENAT VERPUPPUNGSREIFER LARVEN DES WILDTYPS UND DER MUTANTE *ltr* SOWIE IN 5-TÄGIGEN LARVEN DER MUTANTE *lme*

GENOTYP UND ALTER	n	GLUTAMINSYNTHETASE-AKTIVITÄT PRO LARVE ($\mu\text{M. } 10^{-3}$)
$+/+$ (5d)	3	$6,50 \pm 1,00$
<i>ltr/ltr</i> (6d)	3	$3,60 \pm 0,75$
<i>lme/lme</i> (5d)	3	$4,58 \pm 0,32$

Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte und deren mittlere Fehler.

die freien Aminosäuren, für die entsprechenden Substanzen in den Proteinen ist die Erhöhung weniger deutlich. Dem entspricht bei *ltr* ein etwas erhöhter Gesamtstickstoffgehalt (Hadorn und Stumm-Zollinger, 1953). Bei *ltr* ist auch das Frischgewicht grösser als beim Wildtyp. Diese Gewichtsdivergenz ist aber eher geringer als erwartet (Chen, 1956). Vermutlich zeigt sich hier eine nach Genotyp unterschiedliche Beeinflussung des Wachstums durch Mangel an Glucose. Eine solche Interpretation wird durch Experimente von Hollingsworth und Burcombe (1970) nahegelegt. Im Gegensatz zu den eben geschilderten Verhältnissen für *ltr* zeigt *lme* pro Larve für jede Aminosäure geringere Absolutwerte als $+/+$. Die Reduktion betrifft in erster Linie die proteingebundenen ninhydrinpositiven Substanzen (nur 44% von $+/+$), weniger die freien (77% von $+/+$). Entsprechend ist bei *lme* der Gesamtstickstoffgehalt stark reduziert (Chen, 1958), desgleichen der Proteingehalt (Abb. 1) und das Frischgewicht (Tab. I).

Ein Vergleich der Konzentrationsbestimmung der Aminosäuren beim Wildtyp mit publizierten Daten, die mit Hilfe anderer Methoden an nicht sterilen Tieren gewonnen wurden, zeigt Uebereinstimmung der Grössenordnung (Chen und Hanimann, 1965; Chen, Kubli, und Hanimann, 1968). Vergleicht man die Konzentrationen der freien Aminosäuren bei *ltr* mit den Daten von Stumm-Zollinger (1954), so zeigt sich, dass das Muster im Totalhomogenat verschieden ist von demjenigen der Hämolymphe. Eine Anreicherung von freiem Glutamin bei der Mutante *ltr* fand auch diese Autorin in der Hämolymphe, sowie Chen, Kubli, und Hanimann (1968) in Hämolymphe und Larvenextrakt. Letztere fanden auch eine Anhäufung von Lysin. Die relative Anreicherung von Glutamin lässt sich kaum begründen, handelt es sich doch um eine zentrale Substanz im Stoffwechsel, die an mannigfachen Umwandlungen beteiligt sein kann.

Eine Akkumulation von Glycin in Larven vom Genotyp *lme* fanden Chen und Hadorn (1955) ebenfalls bei nicht sterilen Larven. Welche Bedeutung diese Anreicherung hat, lässt sich vorderhand nicht entscheiden. Glycin ist eine Schlüsselsubstanz im Stoffwechsel. Es spielt bei Insekten eine Rolle für die Synthese von Porphyrinen und damit

für Enzyme wie Cytochrome, Katalase, Peroxidase und Tryptophanpyrrolase. Es wird auch für die Purinsynthese gebraucht und spielt ganz allgemein eine Rolle für den Stoffwechsel von C_1 -Einheiten (Corrigan, 1970). Nach Baumann (1969) ist der Turnover des freien Glycin bei *lme*-Larven nur etwa $1/3$ so gross wie bei $+/+$. Dieser Effekt könnte zur Akkumulation der Aminosäure beitragen. Die geringere Anhäufung von Threonin dürfte mit der Akkumulation des Glycin in Zusammenhang stehen, kann doch Threonin als Vorläufer des Glycin funktionieren (Mahler und Cordes, 1971).

Interessant ist die Tatsache, dass im Proteinhydrolysat das Muster der Aminosäuren bei allen drei Genotypen identisch ist (Abb. 3), ganz im Gegensatz zur Verteilung der freien Aminosäuren (Abb. 2). Das deutet bereits darauf hin, dass dieser freie Pool nicht mit dem für die Proteinsynthese zur Verfügung stehenden Pool identisch ist.

2. RADIOAKTIVITÄT DER NINHYDRINPOSITIVEN SUBSTANZEN

Wie wir früher gesehen haben (S. 186), sind die extrahierten, freien Aminosäuren nicht identisch mit dem Pool, aus welchem die Proteinsynthese gespeist wird. Diese Tatsache ist wesentlich für die Bestimmung von Turnover- und Einbauraten radioaktiver Aminosäuren, wie sie auch für *Drosophila* publiziert wurden (Baumann, 1969). Solche Berechnungen basieren auf 3 wichtigen Voraussetzungen (Dinamarca und Levenbook, 1966): Der Pool hat konstante Grösse; es gibt nur einen, homogenen Pool; es gelangt keine Radioaktivität aus dem Proteinabbau in den Pool zurück. Schon Burcombe und Hollingsworth (1970) bezweifeln das Vorhandensein eines homogenen Pools bei *Drosophila*. Die Unterschiede in den spezifischen Aktivitäten zwischen Extrakt und Hydrolysat, die überdies noch genotypisch verschieden sind (Abb. 4, 5), zeigen, dass die Voraussetzung eines einzigen, homogenen Pools nicht erfüllt ist. Damit ist die Durchmischung in Frage gestellt und über Grösse sowie Konstanz des für die Proteinsynthese zur Verfügung stehenden Pools lassen sich ebenfalls keine Angaben machen. Auch die letzte der angeführten Voraussetzungen trifft kaum zu, zeigen doch Untersuchungen bei Ratten (Gan und Jeffay, 1967) und besonders eindrücklich an HeLa-Zellen (Righetti, Little, und Wolf, 1971), dass aus dem Protein- und Peptidabbau Aminosäuren in den freien Pool zurückgegeben werden.

Es hat sich in dieser Arbeit gezeigt, dass der relative Anteil der Synthese von Aminosäuren aus Glucose genotypisch schwankt. Die zugrunde liegenden Mechanismen können verschiedener Art sein. Die Rate der Synthese aus Glucose kann bei den betrachteten Genotypen unterschiedlich sein. Es kann auch bereits die Aufnahme von Glucose im Darm verschieden sein oder die Permeabilität der Zellen für Glucose kann unterschiedlich sein. Ebenso kann man am ungleichen Abbau des Caseins oder an unterschiedliche Resorption der daraus abgespaltenen Aminosäuren denken. Im weiteren können sich Unterschiede in Umwandlungen zwischen den Aminosäuren auswirken. Es wäre auch denkbar, dass die nicht markierte Fructose (aus Saccharose im Nährmedium) in den einzelnen Genotypen die Glucose in verschiedenem Masse konkurrenziert.

Es fällt auf, dass Leucin/Isoleucin, Lysin/Ornithin und Valin bei *lme* durchwegs grössere spezifische Aktivität aufweisen als bei $+/+$ oder gar *ltr* (Abb. 4, 5, 6). Im Futter werden den Larven auch diese Aminosäuren unmarkiert geboten, allerdings in Casein gebunden. Waldner-Stiefelmeier (1967) hat gezeigt, dass die Aktivität der Proteasen im Darm von *lme*-Larven (96^h) auf 42 % reduziert ist im Vergleich zum Wildtyp. Die hier betrachteten Aminosäuren sind essentiell mit Ausnahme von Ornithin, das mit der

beschriebenen Methode nicht allein erfasst werden kann, welches aber kaum messbar vorhanden ist (Chen, Kubli, und Hanimann, 1968). Damit scheint es der geschädigten Larve, die zu wenig von diesen Substanzen aufnehmen kann, möglich, deren Synthese kompensatorisch zu steigern.

3. ESSENTIELLE AMINOSÄUREN

Fütterungsversuche in Sterilzuchten von *Ips cembrae* haben gezeigt, dass Valin, Leucin, Arginin, Threonin und Histidin nicht absolut unentbehrlich sind (Balogun, 1968). Die Larven wachsen auf solchem Mangelfutter langsamer als Kontrolltiere, sie sind aber durchaus lebensfähig. Das würde bedeuten, dass diese fehlenden Aminosäuren in gewissem Masse im Organismus gebildet werden können, eventuell durch Umwandlung anderer Aminosäuren.

Glycin wurde von Hinton, Noyes, und Ellis (1951) aufgrund von Fütterungsexperimenten für *Drosophila* als essentiell postuliert und in der Literatur auch so geführt (Chen, 1962). 1966 zeigte Geer, ebenfalls mit Fütterung, dass Glycin wohl das Larvenwachstum etwas fördert, dass diese Aminosäure aber nicht als essentiell zu betrachten ist. Andere Autoren haben für verschiedene Insekten mit [^{14}C]Glucose (Fütterung oder Injektion) gezeigt, dass diese Aminosäure nicht essentiell ist (Schaefer (1964) für *Neodiprion pratti*, Pickett und Friend (1965) für *Rhodnius prolixus*, Rodriguez und Hampton (1966) für *Tetranychus urticae*, Kasting und McGinnis (1958, 1960) für *Phormia regina*). Die starke Markierung zeigt, dass wir Glycin für *Drosophila melanogaster* nicht als essentiell betrachten müssen. Für die Synthese des Glycin bei Insekten kommen dieselben Wege in Frage, wie für Vertebraten, nämlich aus Serin (Muramatsu, Nagayama, und Shimura, 1961), aus Threonin (Gilmour, 1965) sowie durch Transaminierung aus Glyoxalsäure (Corrigan, 1970).

Threonin gehört zu den auch für *Drosophila* als essentiell betrachteten Aminosäuren (Rudkin und Schultz, 1947). Neuere Fütterungsversuche zeigen absolutes Bedürfnis für Threonin (Geer, 1966). In unseren Versuchen zeigt Threonin erhebliche Markierung und bedeutende spezifische Aktivität. Schwache Aktivität dieser Aminosäure fanden auch Kasting und McGinnis (1962) bei *Agrotis orthogonia* und Strong und Sakamoto (1963) bei *Myzus persicae* nach Applikation von [^{14}C]Glucose. Sehr starke Markierung erhielten Rodriguez und Hampton (1966) nach Verfütterung von [^{14}C]Glucose an *Tetranychus urticae*. Rock und King (1968) wollten allerdings wahrscheinlich machen, dass diese Aktivitäten einem methodischen Fehler zuzuschreiben seien. Unsere Arbeit bestätigt aber die Markierung von Threonin und methodische Fehler lassen sich dabei ausschliessen. Möglicherweise wird auch *in vivo* durch die Threoninaldolase aus Glycin + Acetaldehyd Threonin aufgebaut (S. 186).

Phenylalanin gehört zu den für *Drosophila melanogaster* als essentiell betrachteten Aminosäuren (Chen, 1962). Neuere Fütterungsversuche bestätigen diese Klassifizierung (Geer, 1966). Unsere Versuche zeigen eindeutig, dass Phenylalanin nach [^{14}C]Glucose-Fütterung bei +/+ und *lme* Markierung trägt. Es besteht die Möglichkeit, dass ein C_6 -Ring aromatisiert würde, wie das bei einigen Säugergeweben nachgewiesen ist (Beer, Dickens, und Pearson, 1951). Der Aufbau nicht-aromatischer C_6 -Ringe scheint auch bei Insekten möglich und zwar als Terpene aus Isopren-Einheiten (Gilmour, 1965).

Valin wird auch für *Drosophila* als essentiell betrachtet (Chen, 1962). Dies wird durch neuere Fütterungsexperimente bestätigt (Geer, 1966). In unseren Versuchen zeigt diese Aminosäure bei den beiden Letalmutanten Radioaktivität. Das bedeutet, dass ihr

Kohlenstoffgerüst teilweise von der Glucose abgeleitet sein muss. Allerdings finden sich in der Literatur keinerlei Anhaltspunkte für diese Synthese bei höheren Organismen.

Leucin und Isoleucin sind laut Fütterungsexperimenten für *Drosophila* essentiell (Geer, 1966). Weder die Literatur noch eigene Experimente geben Anhaltspunkte dafür, wie die beobachtete Markierung zustande kommt.

Arginin, welches für den Phosphatstoffwechsel sehr wichtig ist, muss auch bei *Drosophila* von aussen zugeführt werden (Hinton, Noyes, und Ellis, 1951). Bei Insekten ist bisher kein vollständiger Harnstoffzyklus nachgewiesen (Corrigan, 1970). Daher ist es schwierig, die Markierung des C-Gerüsts zu erklären. Davis (1968) hat aber gezeigt, dass für den Käfer *Oryzaephilus surinamensis* das Arginin-Bedürfnis geringer ist, wenn Prolin und Alanin im Medium höher konzentriert werden. Prolin + Alanin können in Arginin umgewandelt werden. Auch Glutamat kommt als Vorstufe für die Synthese von Arginin in Frage (Meister, 1965). Thayer (1972) hat bei *Aedes aegypti* Anhaltspunkte für diesen Syntheseweg aus Glutaminsäure gefunden.

Histidin trägt möglicherweise zur Aktivität des Doppelfleckes bei *lme* bei. Allerdings scheint die Synthese von Histidin bei Insekten bisher nicht nachgewiesen zu sein (Corrigan, 1970). Interessanterweise fanden Kasting und McGinnis (1960) bei *Phormia*-Larven geringe Markierung von Histidin, Arginin und Methionin nach Injektion von [¹⁴C]Glucose. Sie beurteilen aber die Synthese als ungenügend zur Deckung des Bedarfs.

Der Begriff 'essentiell' wird meist definiert als vom Organismus nicht synthetisierbar (Leuthardt, 1959; Karlson, 1970; Mahler und Cordes, 1971). Darunter fällt nach den vorliegenden Untersuchungen Glycin mit Sicherheit nicht und auch für Threonin hat diese strenge Definition keine Gültigkeit. Phenylalanin, Valin, Leucin/Isoleucin und Arginin/Histidin scheinen ebenfalls in bestimmtem Ausmass von den Larven aus dem C-Gerüst der Glucose aufgebaut zu werden. Sollten systematische, verfeinerte Untersuchungen diese Resultate bestätigen und die zugrunde liegenden Synthesemechanismen aufklären, so drängte sich eine neue Definition des Begriffes 'essentiell' auf.

4. THREONINSYNTHESE *in vitro*

Dazu fehlen bisher Untersuchungen bei Insekten vollständig (Corrigan, 1970). Arbeiten über die Threoninaldolase stammen in erster Linie aus Versuchen mit Organen von Säugetieren. Dieses Enzym katalysiert die folgende Reaktion (Malkin und Greenberg, 1964):—



Die vorliegenden Resultate mit Larvenhomogenaten ergeben bereits bei 7 μM Acetaldehyd starke Hemmung der Synthesereaktion, also bei geringerer Konzentration, als Karasek und Greenberg (1957) für die Threoninaldolase aus Schafleber beschreiben. Das *Drosophila*-Enzym wird durch Cl^- -Ionen erheblich gehemmt, was in Uebereinstimmung steht mit Resultaten von Schirch und Diller (1971) an Threoninaldolase aus Kaninchenleber. Der optimale pH-Wert von 7,1 beim Enzym aus *Drosophila* liegt etwas tiefer als die Werte für Schafleber (Karasek und Greenberg, 1957), Rattenleber (Malkin und Greenberg, 1964) oder Kaninchenleber (Schirch und Gross, 1968). Er stimmt gut überein mit dem optimalen Wert von 7,0 für *Clostridium* (Jungermann, Schmidt, Kirchniawy, Rupprecht, und Thauer, 1970).

Pyridoxalphosphat ist auch bei *Drosophila* stark ans Enzym gebunden, wie das Jungermann et al. (1970) für *Clostridium* gefunden haben. Mit Hydroxylamin lässt es

sich jedoch abspalten und durch erneute Zugabe ist die Enzymaktivität wieder herstellbar, wie das auch beim Enzym aus Rattenleber gefunden wurde (Malkin und Greenberg, 1964). Wie beim Enzym aus Schafleber (Karasek und Greenberg, 1957) fand sich auch bei *Drosophila* keine Abhängigkeit der Aktivität von Schwermetallionen (EDTA-Zugabe). Dialyse des Homogenates führte zum fast vollständigen Verlust der Aktivität.

Im Verlauf der Ontogenese verändert sich bei +/+ und *lme* die Enzymaktivität parallel zum Proteingehalt, wie das auch für verschiedene Dehydrogenasen gezeigt worden ist (Rechsteiner, 1970). Damit sind auch die spezifischen Aktivitäten des Enzyms in beiden Genotypen gleich, ebenso wie die spezifischen Aktivitäten des freien Threonin (Abb. 4). Bei *ltr* zeigt die Aktivität einen offensichtlichen Zusammenbruch vor der Verpuppung. Dieses Absinken fand Borner auch für unspezifische Esterasen (mündl. Mitt.). Ein solches Verhalten deutet darauf hin, dass die Threoninsynthese *in vivo* wichtiger ist als die Abbaureaktion. Das vermuten auch Karasek und Greenberg (1957) aufgrund von Untersuchungen der Gleichgewichtskonstanten der Threoninaldolase-Reaktionen aus Schafleber. Für katabole Enzyme wäre ein solcher Abfall zu diesem Zeitpunkt kaum verständlich.

5. GLUTAMINSYNTHESE *in vitro*

Dazu liegen bei Insekten nur sehr wenige Untersuchungen vor. Die direkte Messung des entstehenden Glutamin wird durch den hohen Metabolismus dieser Substanz gestört. Daher wird die Glutaminsäure im Gegensatz zu den Arbeiten von Chen und Bachmann-Diem (1964) in eine metabolisch inaktive Form übergeführt. Das Enzym katalysiert folgende Reaktion (Levintow und Meister, 1954):—



Ueber den genauen Mechanismus herrscht noch keine Klarheit (Gonzalez und Ottaway, 1971). Beim Vorliegen gereinigter Enzympräparate misst man das bei der Reaktion freiwerdende Phosphat (Woolfolk, Shapiro, und Stadtman, 1966). Im Ansatz mit Homogenat ersetzt man den Ammoniak besser durch Hydroxylamin (Meister, 1968). Dabei wird durch die Glutaminsynthetase der Glutamylrest auf dieses Molekül übertragen und man misst dann das entstehende L-Glutamyl- γ -monohydroxamat (Wu, 1963). Das pH von 7,0 wurde gewählt in Anlehnung an die Arbeiten von Woolfolk, Shapiro, und Stadtman (1966) mit Enzym aus *Escherichia coli*.

Die optimale ATP-Konzentration (Abb. 9a), liegt bei 7,5 $\mu\text{M}/\text{ml}$, also 25 % tiefer als für *E. coli* (Woolfolk, Shapiro, und Stadtman, 1966) und um 50 % höher als der von Levenbook und Kuhn (1962) an *Prodenia eridania* bestimmte Wert.

Die Konzentration der Glutaminsäure (Abb. 9b) beeinflusst die Aktivität in einem weiten Bereich nur wenig. Bei Konzentrationen über 75 $\mu\text{M}/\text{ml}$ macht sich allmählich eine Hemmung bemerkbar, also bei wesentlich geringeren Werten als für die entsprechenden Enzyme aus *Nocardia corallina* (Kajinami und Smith, 1971) oder gar *Prodenia eridania* (Levenbook und Kuhn, 1962).

Die Optimierung für Magnesium (Abb. 9c) zeigt von 20–60 $\mu\text{M}/\text{ml}$ nur geringe Hemmung der enzymatischen Aktivität. Unter 20 $\mu\text{M}/\text{ml}$ sinkt sie dagegen sehr rasch ab. Dieses System braucht also doppelt so viele Mg^{2+} -Ionen wie die Präparation von Levenbook und Kuhn (1962), um optimal zu arbeiten.

Die grösste Aktivität zeigt das Enzym bei einer CysteinKonzentration von 50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (Abb. 9d). Damit liegt dieser Wert $5\times$ so hoch wie bei Rattenleberhomogenat (Wu, 1963).

Für eine Erklärung des starken Anstiegs der relativen Aktivität bei *lme* vor der Verpuppung (Abb. 10) sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die Grössenordnung der Synthetaseaktivität in Larven stimmt mit derjenigen für Puppen von *Prodenia eridania* überein (Levenbook und Kuhn, 1962). Entgegen unserer ursprünglichen Erwartung zeigt sich keine direkte Relation zwischen Glutamingehalt und Glutaminsynthetase-Aktivität, auch nicht, wenn man diese pro Tier berechnet (Tab. V). Zu einem solchen Schluss kommen auch Levenbook und Kuhn (1962) bei ihren Arbeiten.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Larven des Wildtyps sowie der Letalmutanten *l(3)tr* und *l(2)me* von *Drosophila melanogaster* werden auf sterilem Medium aufgezogen und auf ihren Gehalt an freien und proteingebundenen Aminosäuren hin untersucht. Es zeigt sich, dass der Gehalt an freien, ninhydrinpositiven Substanzen weitgehend mit den Schwankungen der Frischgewichte korreliert ist. Der Proteingehalt ist bei sterilen Larven niedriger als bei nicht-sterilen. Diese Reduktion ist am deutlichsten bei *lme*-Larven.

2. Die molaren Konzentrationen der Aminosäuren sind bei *ltr* durchweg höher als beim Wildtyp. Diese Erhöhung ist für die freien Aminosäuren grösser als für die proteingebundenen. *lme* zeigt pro Larve in jedem Fall (Ausnahme: Glycin bei den freien Aminosäuren) geringere Konzentration als +/+, wobei in erster Linie die proteingebundenen Aminosäuren reduziert sind.

3. Das relative Muster der freien Aminosäuren ist für alle 3 Genotypen verschieden. Bei *ltr* sind Glutamin und Lysin gegenüber +/+ angehäuft. Bei *lme* sind Glycin und Threonin stärker vertreten als im Wildtyp. Im Proteinhydrolysat zeigen die relativen Konzentrationen keine genotypischen Unterschiede.

4. Untersuchungen über die Synthese der einzelnen Aminosäuren nach Zugabe von [¹⁴C]Glucose ergeben, dass α -Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Prolin, Serin, Threonin, Glutamin und eine unbekannte Substanz (U_3) bei allen 3 Genotypen markiert sind. Dazu kommen bei +/+ Tyrosin und Phenylalanin, bei *ltr* β -Alanin, Tyrosin und Valin, bei *lme* Arginin/Histidin, Asparagin, Leucin/Isoleucin und Valin.

5. Die relative Verteilung der Aktivitäten variiert je nach Genotyp und ist auch zwischen freien und proteingebundenen Aminosäuren unterschiedlich.

6. Die spezifischen Aktivitäten zeigen, dass der relative Anteil der Aminosäuresynthese aus Glucose genotypisch unterschiedlich ist. Zudem ist das Muster der spezifischen Aktivitäten bei freien und proteingebundenen Aminosäuren verschieden, sodass der freie Pool nicht mit dem für die Proteinsynthese zur Verfügung stehenden Pool identisch ist.

7. In Abweichung von der bisherigen Auffassung zeigt sich, dass Glycin und Threonin so stark synthetisiert werden, dass man sie für *Drosophila* nicht als essentiell bezeichnen sollte. Die vorliegende Arbeit gibt Hinweise darauf, dass für Phenylalanin, Valin, Leucin/Isoleucin und Arginin/Histidin der Begriff 'essentiell' im strengen Sinn nicht anwendbar ist.

8. Es werden erstmals bei Insekten *in vitro* Untersuchungen zur synthetischen Aktivität der Threoninaldolase durchgeführt. Dabei zeigt *ltr* eine Abweichung vom Verhalten des Wildtyps, indem die Aktivität vor der Verpuppung zusammenbricht. Dagegen ist die Mutante *lme* dem Wildtyp vergleichbar.

9. Im *in vitro*-System wurde die Aktivität der Glutaminsynthetase untersucht. Dabei zeigen *ltr* und der Wildtyp gleiches Verhalten. Die Mutante *lme* weicht davon ab, indem hier die spezifische Aktivität vor der Verpuppung stark ansteigt. Es ergibt sich keine direkte Beziehung zwischen der Enzymaktivität und dem Glutamingehalt der Tiere.

LITERATURVERZEICHNIS

- BALOGUN, R. A. (1968), 'Rearing of *Ips cembrae* larvae on artificial diets: some essential amino acids and sugars', *J. Insect Physiol.*, **15**, 141-148.
- BAUMANN, P. (1969), 'Untersuchungen zum Proteinstoffwechsel bei alternden Adultmännchen, Larven des Wildtyps und der Letalmutanten (*ltr* und *lme*) von *Drosophila melanogaster*', *Z. vergl. Physiol.*, **64**, 212-242.
- BEER, C. T., DICKENS, F., und PEARSON, J. (1951), 'The aromatization of hydrogenated derivatives of benzoic acid in animal tissues', *Biochem. J.*, **48**, 222-237.
- BRIEGEL, H. (1969), 'Untersuchungen zum Aminosäuren- und Proteinstoffwechsel während der autogenen und anautogenen Eireifung von *Culex pipiens*', *J. Insect Physiol.*, **15**, 1137-1166.
- BURCOMBE, J. V., und HOLLINGSWORTH, M. J. (1970), 'The total nitrogen, protein, amino acid and uric acid content of ageing *Drosophila*', *Exp. Geront.*, **5**, 247-255.
- CHEN, P. S. (1956), 'Elektrophoretische Bestimmung des Proteingehaltes im Blut normaler und letaler (*ltr*) Larven von *Drosophila melanogaster*', *Rev. Suisse Zool.*, **63**, 216-229.
- CHEN, P. S. (1958), 'Weitere Untersuchungen zur Stoffwechselphysiologie der Mutante *letal-meander* (*lme*) von *Drosophila melanogaster*', *Arch. f. d. Klaus-Stift. f. Vererb.*, **33**, 82-90.
- CHEN, P. S. (1962), 'Free amino acids in insects', in *Amino Acid Pools* (ed. Holden), pp. 115-135. Amsterdam: Elsevier.
- CHEN, P. S. (1971), 'Biochemical aspects of insect development', in *Monographs in Developmental Biology* (ed. Wolsky), vol. 3. Basel: Karger.
- CHEN, P. S., und BACHMANN-DIEM, C. (1964), 'Studies on the transamination reactions in the larval fat body of *Drosophila melanogaster*', *J. Insect Physiol.*, **10**, 819-829.
- CHEN, P. S., und DIEM, C. (1961), 'A sex-specific ninhydrin-positive substance found in the paragonia of adult males of *Drosophila melanogaster*', *J. Insect Physiol.*, **7**, 289-298.
- CHEN, P. S., und HADORN, E. (1955), 'Zur Stoffwechselphysiologie der Mutante *letal-meander* (*lme*) von *Drosophila melanogaster*', *Rev. Suisse Zool.*, **62**, 338-347.
- CHEN, P. S., und HANIMANN, F. (1965), 'Ionenaustausch-chromatographische Untersuchungen über die freien Aminosäuren und deren Derivate in *Drosophila melanogaster*', *Z. Naturf.*, **20b**, 4, 307-312.
- CHEN, P. S., KUBLI, E., und HANIMANN, F. (1968), 'Auftrennung der freien Ninhydrin-positiven Stoffe in *Phormia* und *Drosophila* mittels zwei-dimensionaler Hochspannungselektrophorese', *Rev. Suisse Zool.*, **75**, 509-523.
- CHURCH, R. B., und ROBERTSON, F. W. (1966), 'A biochemical study of the growth of *Drosophila melanogaster*', *J. exp. Zool.*, **162**, 337-351.
- CORRIGAN, J. J. (1970), 'Nitrogen metabolism in insects'. In *Comparative Biochemistry of Nitrogen Metabolism. I. The Invertebrates* (ed. Campbell), pp. 387-488. London: Academic Press.
- DAVIS, G. R. F. (1968), 'Dietary alanine and proline requirements of the beetle *Oryzaephilus surinamensis*', *J. Insect Physiol.*, **14**, 1247-1250.
- DINAMARCA, M. L., und LEVENBOOK, L. (1966), 'Oxidation, utilisation and incorporation into protein of alanine and lysine during metamorphosis of the blowfly *Phormia regina* (Meigen)', *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**, 110-119.
- FISCHER, F. G., und DÖRFEL, H. (1953), 'Zur quantitativen Auswertung der Papierchromatogramme von Eiweiss-Hydrolysaten', *Biochem. Z.*, **324**, 544-566.
- GAN, J. C., und JEFFAY, H. (1967), 'Origins and metabolism of the intracellular amino acid pools in rat liver and muscle', *Biochim. biophys. Acta*, **148**, 448-459.
- GEER, B. W. (1965), 'A new synthetic medium for *Drosophila*', *D.I.S.*, **40**, 96.
- GEER, B. W. (1966), 'Utilisation of D-amino acids for growth by *Drosophila melanogaster* larvae', *J. Nutr.*, **90**, 31-39.
- GILMOUR, D. (1965), *The Metabolism of Insects*. London: Oliver & Boyd.

- GONZALEZ, M. P., und OTTAWAY, J. H. (1971), 'Isozymes of glutamine synthetase in rat tissues', *Biochem. J.*, **125**, 35P-36P.
- HADORN, E., und STUMM-ZOLLINGER, E. (1953), 'Untersuchungen zur biochemischen Auswirkung der Mutation "letal-translucida" (*ltr*) von *Drosophila melanogaster*', *Rev. Suisse Zool.*, **60**, 506-516.
- HARPER, A. E., BENEVENGA, N. J., und WOHLHUETER, R. M. (1970), 'Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids', *Physiol. Rev.*, **50**, 428-558.
- HINTON, T., NOYES, D. T., und ELLIS, J. (1951), 'Amino acids and growth factors in a chemically defined medium for *Drosophila*', *Physiol. Zool.*, **24**, 335-353.
- HOLLINGSWORTH, M. J., und BURCOMBE, J. V. (1970), 'The nutritional requirements for longevity in *Drosophila*', *J. Insect Physiol.*, **16**, 1017-1025.
- JUNGERMANN, K. A., SCHMIDT, W., KIRCHNIAWY, F. H., RUPPRECHT, E. H., und THAUER, R. K. (1970), 'Glycine formation via threonine and serine aldolase—its interrelation with the pyruvate formate lyase pathway of one-carbon unit synthesis in *Clostridium kluyveri*', *Eur. J. Biochem.*, **16**, 424-429.
- KAJINAMI, S., und SMITH, E. C., (1971), 'Glutamine synthetase from *Nocardia corallina*', *J. Biochem.*, **69**, 429-432.
- KARASEK, M. A., und GREENBERG, D. M. (1957), 'Studies on the properties of threonine aldolase', *J. biol. Chem.*, **227**, 191-205.
- KARLSON, P. (1970), *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*, 7 Aufl. Stuttgart: Thieme.
- KASTING, R., und MCGINNIS, A. J. (1958), 'Use of glucose labelled with carbon-14 to determine the amino-acids essential for an insect', *Nature, Lond.*, **182**, 1380-1381.
- KASTING, R., und MCGINNIS, A. J. (1960), 'Use of glutamic acid-U- C^{14} to determine nutritionally essential amino acids for larvae of the blowfly, *Phormia regina*', *Can. J. Biochem. Physiol.*, **38**, 1229-1234.
- KASTING, R., und MCGINNIS, A. J. (1962), 'Nutrition of the pale western cutworm *Agrotis orthogonia* Morr. (Lepidoptera, Noctuidae). IV. Amino acid requirements determined with Glucose-U- C^{14} ', *J. Insect Physiol.*, **8**, 97-103.
- LEUTHARDT, F. (1959), *Lehrbuch der Physiologischen Chemie*, 14 Aufl. Berlin: De Gruyter.
- LEVENBOOK, L., und KRISHNA, I. (1971), 'Effect of ageing on amino acid turnover and rate of protein synthesis in the blowfly *Phormia regina*', *J. Insect Physiol.*, **17**, 9-12.
- LEVENBOOK, L., und KUHN, J. (1962), 'Properties and distribution of glutamine synthetase in the southern armyworm, *Prodenia eridania*', *Biochim. biophys. Acta*, **65**, 219-232.
- LEVINTOW, L., und MEISTER, A. (1954), 'Reversibility of the enzymatic synthesis of glutamine', *J. biol. Chem.*, **209**, 265-280.
- LIPMANN, F., und TUTTLE, L. C. (1945), 'A specific micromethod for the determination of acyl phosphates', *J. biol. Chem.*, **159**, 21-28.
- LOFTFIELD, R. B. (1960), 'Scintillation counting of C^{14} labeled paper chromatograms', *Atomlight*, **13**, 1-5. Boston: New England Nuclear Corp.
- MAHLER, H. R., und CORDES, E. H. (1971), *Biological Chemistry*, 2nd ed. New York: Harper & Row.
- MALKIN, L. I., und GREENBERG, D. M. (1964), 'Purification and properties of threonine or allo-threonine aldolase from rat liver', *Biochim. biophys. Acta*, **85**, 117-131.
- MEISTER, A. (1965), *Biochemistry of the Amino Acids*. London: Academic Press.
- MEISTER, A. (1968), 'The specificity of glutamine synthetase and its relationship to substrate conformation at the active site', *Adv. Enzymol.*, **31**, 183-218.
- MURAMATSU, M., NAGAYAMA, H., und SHIMURA, K. (1961), 'Studies on the biosynthesis of glycine in the silkworm. I. Formation of glycine from serine', *J. Biochem., Tokyo*, **49**, 55-58.
- PICKETT, C., und FRIEND, W. G. (1965) 'The nutritionally essential amino acids of *Rhodnius prolixus* (Stål), determined with glucose-U- C^{14} ', *J. Insect Physiol.*, **11**, 1617-1623.
- RECHSTEINER, M. C. (1970), '*Drosophila* lactate dehydrogenase and α -glycerolphosphate dehydrogenase: distribution and change in activity during development', *J. Insect Physiol.*, **16**, 1179-1192.
- RIGHETTI, P., LITTLE, E. P., und WOLF, G. (1971), 'Reutilization of amino acids in protein synthesis in HeLa cells', *J. biol. Chem.*, **246**, 5724-5732.

- ROCK, G. C., and KING, K. W. (1968), 'Amino acid synthesis from glucose-U- ^{14}C in *Argyrotaenia velutinana* (Lepidoptera: Tortricidae) larvae', *J. Nutr.*, **95**, 369-373.
- RODRIGUEZ, J. G., and HAMPTON, R. E. (1966), 'Essential amino acids determined in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acarina, Tetranychidae) with glucose-U- C^{14} ', *J. Insect Physiol.*, **12**, 1209-1216.
- RUDKIN, G. T., and SCHULTZ, J. (1947), 'Evolution of nutritional requirements in animals: amino-acids essential for *Drosophila melanogaster*', *Anat. Rec.*, **99**, 613.
- RÜEGG, M. K. (1968), 'Untersuchungen zum Proteinstoffwechsel des Wildtyps und der Letalmutante (*ltr*) von *Drosophila melanogaster*', *Z. vergl. Physiol.*, **60**, 275-307.
- SANG, J. H. (1956), 'The quantitative nutritional requirements of *Drosophila melanogaster*', *J. exp. Biol.*, **33**, 45-72.
- SCHAEFER, CH. H. (1964), 'Free amino acids of the Virginia pine sawfly, *Neodiprion pratti* (Dyar): their chromatographic determination and biosynthesis', *J. Insect Physiol.*, **10**, 363-369.
- SCHIRCH, L. V., and DILLER, A. (1971), 'Serine transhydroxymethylase. Affinity of the active site for substrates, substrate analogues, and anions', *J. biol. Chem.*, **246**, 3961-3966.
- SCHIRCH, L. V., and GROSS, T. (1968), 'Serine transhydroxymethylase', *J. biol. Chem.*, **243**, 5651-5655.
- STEELE, R. (1952), 'The formation of amino acids from carbohydrate carbon in the mouse', *J. biol. Chem.*, **198**, 237-244.
- STRONG, F. E., and SAKAMOTO, S. S. (1963), 'Some amino acid requirements of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), determined with glucose-U- C^{14} ', *J. Insect Physiol.*, **9**, 875-879.
- STUMM-ZOLLINGER, E. (1954), 'Vergleichende Analyse der Aminosäuren und Peptide in der Hämolymphe des Wildtyps und der Mutante "letal-translucida" (*ltr*) von *Drosophila melanogaster*', *Z. indukt. Abstammungs und Vererbungslehre*, **86**, 126-133.
- THAYER, D. W. (1972), 'Effect of dietary amino acid on the amino acid pool of *Aedes aegypti*', *J. Insect Physiol.*, **18**, 521-526.
- WALDNER-STIEFELMEIER, R. D. (1967), 'Untersuchungen über die Proteasen im Wildtyp und in den Letalmutanten (*lme* und *ltr*) von *Drosophila melanogaster*', *Z. vergl. Physiol.*, **56**, 268-289.
- WOOLFOLK, C. A., SHAPIRO, B., and STADTMAN, E. R. (1966), 'Regulation of glutamine synthetase. I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*', *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 177-192.
- WU, C. (1963), 'Glutamine synthetase. I. A comparative study of its distribution in animals and its inhibition by DL-allo- δ -hydroxylysine', *Comp. Biochem. Physiol.*, **8**, 335-351.

Key Word Index: *Drosophila melanogaster* larvae, lethal mutants *l(3)tr* and *l(2)me*, amino-acid synthesis, essential amino-acids.

Sonderdruck aus
Insect Biochemistry, Bd. 3, S. 181-204 (1973)
Sciencetechnica (Publishers) Ltd. · Bristol · England